

氏 名（本籍）	稲 村 健太郎（栃 木 県） <small>いな むら けんたろう</small>
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	博 甲 第 4077 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	人肝癌細胞株における JAK/STAT シグナルを介したインターフェロン・アルファ の細胞増殖抑制効果の検討

主 査	筑波大学教授	医学博士	兵 頭 一之介
副 査	筑波大学教授	医学博士	長 田 道 夫
副 査	筑波大学助教授	医学博士	竹 内 薫
副 査	筑波大学講師	博士（工学）	奥 脇 暢

論 文 の 内 容 の 要 旨

目的：抗ウイルス治療としてのインターフェロン投与により，結果として慢性肝炎，肝硬変からの肝細胞癌の発症が抑制されるとの報告は多い。またインターフェロンは臨床的には肝細胞癌増殖抑制を目的に抗がん剤との併用が検討されているが，そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究はインターフェロンによる肝細胞癌発症抑制のメカニズムを解明し，肝細胞癌の増殖を抑制する新たな方法の開発を目的とした。

対象と方法：第一章では人肝癌細胞株 HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5, Huh7 を用いインターフェロン受容体の発現量と細胞増殖抑制効果の関係を調べた。またインターフェロンによるシグナル伝達の細胞増殖への影響を検討するために JAK/STAT シグナル伝達と代表的な細胞増殖のシグナル伝達である MAPK のクロストークを検討した。さらに JAK1 および STAT1 を siRNA でノックダウンすることによるインターフェロンの細胞増殖抑制効果への影響を検討した。

第二章では，mock 処理を行った細胞と siRNA で STAT1 をノックダウンさせた細胞にインターフェロン刺激で発現する遺伝子をマイクロアレイで比較し，JAK/STAT シグナル伝達に制御される遺伝子群の解析を行った。また転写因子結合部位検索ソフトを用いマイクロアレイのデータから遺伝子を制御する転写因子の解析を行った。同様にマイクロアレイのデータを文献検索ソフトで解析を行い，インターフェロンにより発現する肝細胞癌抑制にかかわる遺伝子の検索を行い，リアルタイム定量 PCR でその遺伝子発現の確認を行った。

結果：第一章ではインターフェロン受容体の発現が最も多い PLC/PRF/5 がインターフェロンに対する細胞増殖抑制効果が高かった。インターフェロン刺激で細胞増殖に関わるシグナル伝達である MAPK の活性化の抑制を認めた。また siRNA で JAK1 および STAT1 をノックダウンすることにより MAPK に対する影響と細胞増殖抑制効果の両方が消失することを確認した。このことからインターフェロン刺激で JAK/STAT カスケードから MAPK カスケードに抑制的なクロストークが存在することを証明した。

第二章では STAT1 と遺伝子群との関係を検討した結果，セルロプラスミンとレドックス蛋白であるグルタレドキシンを抽出した。さらにリアルタイム定量 PCR を用いインターフェロン刺激によりセルロプラス

ミンとグルタレドキシンの発現が増加し、siRNAでSTAT1をノックダウンすることにより両方の発現が抑制されることを確認した。

考察：インターフェロン刺激後5分という非常に短時間でMAPKのリン酸化の抑制を認め、STAT1およびJAK1をsiRNAでノックダウンすることによりMAPKに対する影響が消失、さらに細胞増殖抑制効果も消失することからJAK/STATシグナル伝達とMAPKシグナル伝達に抑制的なクロストークがあることが示された。このことからインターフェロンによる癌抑制作用のターゲットとしてMAPKシグナル、特にRafのリン酸化は抑制されなかったが、MEKおよびその下流であるERKのリン酸化が抑制される結果からMEKがインターフェロンの癌抑制作用のターゲットとなっていることが示唆された。肝細胞癌においてMAPKの発現が増加しているという報告もあり、肝細胞癌に対する分子標的薬のターゲットとして、また慢性肝炎、肝硬変における肝発癌の予防薬としてMEKの活性化を特異的に抑制する新たな分子標的薬の登場が期待される。

インターフェロン刺激で発現する遺伝子群の比較を行ったところセルロプラスミンおよびグルタレドキシンというレドックス蛋白の遺伝子が認められた。これらが活性酸素種を抑制することにより肝発癌を抑制する可能性が示唆された。しかしこの実験においてセルロプラスミンおよびグルタレドキシンが蛋白レベルでインターフェロンにより発現が増強するという結果は得られておらず、さらにインターフェロンにより活性酸素種が抑制されるというデータは出ていない。この点は今後の課題である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文の第一章は肝癌細胞株にインターフェロンを作用させた時に生じるシグナル伝達系の変化を検討したものである。JAK/STATが細胞増殖のシグナル伝達であるMAPKシグナル伝達を抑制することを明らかにしたもので、この経路によるインターフェロンの腫瘍増殖抑制効果が示唆されている。これは参考文献として添えられたBiochimica et Biophysica Acta 1745: 401-410, 2005に筆頭著者として掲載されている。この系がインターフェロン特有の腫瘍抑制効果であるか、インターフェロンに感受性を示す腎癌細胞など他のがん種での確認が望まれるとの指摘があった。学位審査時、委員より論文に出てくる“インターフェロンによる肝細胞癌発症予防”と“インターフェロンによる癌細胞増殖抑制作用”との混同が見られ一部不適切に使用されている旨指摘があった。著者（申請者）は指摘を理解し、修正した。第二章ではDNAマイクロアレイの結果の解釈につき委員からの質問があったが、著者は考察に関する妥当な説明を行った。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。